

加味四逆散对肝纤维化大鼠肝组织 IV 型胶原和 TGF β_1 mRNA 表达的影响

郑旭锐¹, 李长秦¹, 孙守才¹, 宋健¹, 周滢^{2*}

(1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 重庆医科大学, 重庆 400060)

[摘要] 目的: 观察加味四逆散对肝脏 IV 型胶原 (COL-IV) 和转化生长因子 β_1 (TGF β_1) mRNA 的影响, 探讨其抗肝纤维化的作用机制。方法: 将 50 只动物购回后随机分为 4 组, 除空白对照组 10 只外, 其余 40 只均用二甲亚硝胺 (DMN, 用生理盐水稀释至 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 以 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重 ip, 每日 1 次, 每周连续 3 d, 连续 4 周的方法制备大鼠肝纤维化模型, 加味四逆散按生药量以 $35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 给药, 采用实时定量 PCR 技术检测各组大鼠肝组织 IV 型胶原和 TGF β_1 mRNA 表达的水平。结果: 加味四逆散组大鼠肝组织 COL-IV mRNA 为 5.136 ± 1.32 , TGF β_1 mRNA 为 4.839 ± 0.48 , 与病理模型组 (COL-IV mRNA 10.369 ± 1.69 , TGF β_1 mRNA 6.307 ± 0.85) 比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论: 加味四逆散能够抑制肝纤维化大鼠肝组织 COL-IV 和 TGF β_1 mRNA 表达, 从而发挥其抗肝纤维化的作用。

[关键词] 加味四逆散; 肝纤维化; IV 型胶原; 转化生长因子 β_1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0218-03

Effects of Jiawei Sini San on Expression of Collagen IV and Transforming Growth Factor-beta 1 of Hepatic Fibrosis in Rats

ZHENG Xu-rui¹, LI Chang-qin¹, SUN Shou-cai¹, SONG Jian¹, ZHOU Ying^{2*}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Chongqing Medical University, Chongqing 400060, China)

[Abstract] **Objective:** The mechanism of Jiawei Sini San (JWSNS) in treating hepatic fibrosis was reexplored and studied by observing the expression of collagen IV and transforming growth factor-beta (TGF β_1) mRNA in liver. **Method:** Fifty animals were randomly divided into 4 groups, in addition to 10 in the control group, the remaining 40 were treated with dimethylnitrosamine (DMN, diluted with saline to $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) to $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip, once daily for 3 d of each week, which lasted 4 weeks. The groups of treatment were fed with JWSNS gavage. Collagen IV and TGF- β_1 were detected in liver samples by RT-PCR. **Result:** CoL-IV and mRNA of Liver tissue in JWSNS group was 5.136 ± 1.32 , TGF β_1 mRNA was 4.839 ± 0.48 , Compared with the pathological model group (CoL-IV mRNA 10.369 ± 1.69 , TGF β_1 mRNA 6.307 ± 0.85) the result were significantly different ($P < 0.05$). **Conclusion:** The mechanism of treating hepatic fibrosis with JWSNS appears to be due to the enhancement of degradation of Collagen IV and TGF- β_1 . JWSNS can treat hepatic fibrosis effectively.

[Key words] Jiawei Sini San; hepatic fibrosis; collagen IV; transforming growth factor-beta 1

加味四逆散是治疗慢性病毒性肝炎的中药复方, 我们在既往的临床观察和动物实验研究已经证实该

方具有良好的防治肝纤维化作用^[1-3]。本实验采用二甲亚硝胺 (DMN) ip 诱导肝纤维化大鼠动物模型,

[收稿日期] 20110318(002)

[第一作者] 郑旭锐, 博士研究生, 讲师, 从事中医药对感染性疾病的防治研究, E-mail: arosexr@163.com

[通讯作者] * 周滢, 博士研究生, 讲师, 从事中药炮制与方剂研究, E-mail: meiren129129@163.com

应用实时定量 PCR 技术检测大鼠肝组织中IV型胶原(COL-IV)、转化生长因子β₁(TGFβ₁) mRNA 表达,探讨加味四逆散抗肝纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 50 只,清洁级,体重(180 ± 20) g,由第四军医大学实验动物中心购进。动物合格证号(军)医动字第 2009050 号

1.2 药品及试剂 加味四逆散煎剂:由黄芪、丹参、姜黄、桃仁、柴胡、甘草、白芍、枳壳组成,各药物比例为 10:10:5:2.5:1.5:1:5:2.5,药物自陕西中医学院附院药房购进,经本院药物鉴定教研室鉴定无伪劣品。加味四逆散药物水煎制备工艺为:药物加水浸泡,第 1 次加水至 400 mL,煎煮 20 min,取液 200 mL,第 2 次再加水至 400 mL,煎煮 20 min,取液 200 mL,两煎相混,过滤,水浴蒸发至每 1 mL 含生药 3.5 g,置于 4 ℃ 冰箱保存备用。秋水仙碱(云南医药集团云南药业有限公司生产,批号 20090309)、TRIzol Regent(Invitrogen 公司)、RT-PCR Kit(大连宝生物工程有限公司)、二甲基亚硝酸胺(Sigma 公司)。

1.3 仪器 BHS 型光学显微镜(Olympus,日本制造),752 型紫外分光光度计(南京麒麟分析仪器有限公司生产),PCR 基因扩增仪(美国贝克曼)。

2 方法

2.1 动物模型制备 大鼠在适应性饲养 1 周后随机选取 10 只作为空白对照组,其余 40 只均用 DMN(用生理盐水稀释至 5 g·L⁻¹)以 10 mL·kg⁻¹体重 ip,每日 1 次,每周连续 3 d,连续 4 周。

2.2 分组 4 周造模结束后,40 只大鼠共死亡 4 只,死亡率为 10%,将剩余 36 只造模大鼠随机分为:

病理模型组、秋水仙碱组、加味四逆散组,每组 12 只。

2.3 给药 空白对照组和病理模型组均以生理盐水 4 mL·kg⁻¹ig;秋水仙碱组:以秋水仙碱 0.01 mg·kg⁻¹ig;加味四逆散组 35 g·kg⁻¹:以加味四逆散煎剂 10 mL·kg⁻¹ig。以上各组用药均 1 次/日,连续用药 30 d 后结束。

2.4 标本制作 实验结束后取部分新鲜肝组织用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,厚 5 μm。

2.5 普通病理组织学观察 病理组织学分级标准为^[4]:“-”级:正常肝脏或无明显胶原纤维增生;“±”级:胶原纤维增生,中央静脉和汇管区有少量纤维索放散延伸,但无间隔形成;“+”级:胶原纤维增生,中央静脉和汇管区结缔组织变厚,由此向四周伸出纤维索,形成不完全间隔;“++”级:胶原纤维大量增生,有个别菲薄的完全间隔形成(假小叶);“+++”级:完全间隔较厚,假小叶大量形成。

2.6 RNA 抽提和 RT 反应 实验结束后取部分新鲜肝组织,按照 Trizol 试剂说明提取总 RNA,加入 20 μL DEPC-treated 水溶解,用紫外分光光度计 260/280 进行样品的浓度测定和质量鉴定,电泳证实总 RNA 的完整性。取 2 μg 总 RAN,按试剂盒(大连宝生物工程有限公司,RT-PCR Kit)说明书进行操作,合成 cDNA。

2.7 实时定量 PCR(Real-time PCR) 根据目的基因在 Genbank 中的已知序列用 primer premier 5.0 设计引物,由大连宝生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 PCR 中应用的引物序列

基因	上游	下游
GAPDH	5'-CATCCCACGGCAAGTCAAT-3'	5'-GGATGCAGGGATGTTCT-3'
IV 型胶原	5'-CGTACCTGCTGACTATCTTCA-3'	5'-GTTGGACACTGGACGCTAG-3'
TGFβ ₁	5'-TCTCAAAATGCAGTG TCTTCTCG-3'	5'-ACTTCCAACCCAGGTCCTTC-3'

Real-time PCR 方法见参考文献[5]。用 ABI prime 7000 SDS 软件求出各样本的 C_T 值,再按公式 $Folds = (C_1/C_2)/(C_3/C_4)$,求出各样本的 Folds 值(C₁:处理样品,待测基因;C₂:处理样品,看家基因;C₃:对样品,待测基因;C₄:对样品,看家基因。C₁₋₄根据标准曲线把 C_T 值换为模板原始浓度)。

2.8 统计学处理 所有数据应用 SPSS 13.0 软件处理,参数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;等级资料采用 Ridit 分析,*P* < 0.05 为有显著性差异。

3 结果

3.1 对大鼠症状表现的影响 实验期间空白组大鼠一直精神状态佳,皮毛光滑密泽,大便正常,进食无异常。所有造模组大鼠,则出现不同程度的精神不振,反应迟钝,饮食摄水明显减少,粪便稀薄,皮毛凌乱,缺乏光泽;治疗组于治疗 3 周后,大便逐渐干燥,进食、摄水增加,精神状态亦随之好转。

3.2 对肝纤维化组织病理学的影响 实验结束后,光镜下观察可见:空白对照组:HE 染色见肝组织结

构清晰,胶原纤维染色仅于汇管区和中央静脉有少许胶原纤维存在。模型组:HE 染色见肝组织结构欠清晰,汇管区及小叶内中度炎性细胞浸润;胶原纤维染色显示汇管区大量胶原沉积,呈较宽的条索状纤维深入肝小叶。各治疗组大鼠仅见轻度汇管区炎症,胶原纤维染色显示纤维结缔组织增生程度减轻,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。说明加味四逆散组对肝纤维化有良好的治疗作用。见表 2。

表 2 肝纤维化各组大鼠肝脏病理组织学变化

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	肝纤维化分级				
			-	±	+	++	+++
空白对照 ¹⁾	-	10	10	0	0	0	0
病理模型	-	12	0	0	2	5	5
秋水仙碱 ¹⁾	1 × 10 ⁻⁵	12	3	3	3	2	1
加味四逆散 ¹⁾	35	12	2	1	4	3	2

注:与病理模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.3 定量 PCR 结果分析 由表 3 可见:病理模型组、秋水仙碱组、加味四逆散组与空白对照组比较,COL-IV,TGFβ₁ mRNA 表达水平增高,差异均有显著性($P < 0.05$)。秋水仙碱组、加味四逆散组与病理模型组比较,COL-IV 和 TGFβ₁ mRNA 表达水平降低,差异均有显著性($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠肝组织 COL-IV,TGFβ₁ mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	COL-IV		TGFβ ₁	
			表达量	表达量	表达量	表达量
空白对照	-	10	0.917 ± 0.29 ¹⁾	1.405 ± 0.46 ¹⁾		
病理模型	-	12	10.369 ± 1.69	6.307 ± 0.85		
秋水仙碱	1 × 10 ⁻⁵	12	3.982 ± 0.63 ¹⁾	4.032 ± 0.27 ¹⁾		
加味四逆散	35	12	5.136 ± 1.32 ¹⁾	4.839 ± 0.48 ¹⁾		

4 讨论

肝纤维化是慢性肝炎向肝硬变发展的必经阶段,是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复过程中的代偿反应。目前,人们普遍认为,肝纤维化是可逆的病理过程^[6-10],因此阻断延缓或逆转肝纤维化的发生发展是治疗肝硬化的关键。

近年来研究发现星状细胞(HSC)是肝纤维化形成的关键。HSC 活化后不仅细胞大量增殖,而且还表现为细胞个体分泌纤维能力增强,大量生成细胞外基质(ECM),其中以胶原成分为主,尤以 I, III, IV 型胶原增多最为显著,并可自分泌转化生长因子 β₁(TGFβ₁),血小板衍生因子(CTGF)等细胞因子维持自身活化状态。TGFβ₁ 能特异性的诱导肝星状细胞产生 CTGF,CTGF 作为其下游效应介质增强 TGFβ₁ 对成纤维细胞和肝星状细胞的作用,刺激星

状细胞和成纤维细胞增殖和 ECM 的合成与分泌^[6-7]。所以减少 TGFβ₁ 在肝组织中的分泌可以减少 ECM 的合成与分泌。

本次实验结果显示与对照组比较病理模型组大鼠肝组织中 COL-IV,TGFβ₁ mRNA 表达水平增高,而加味四逆散组和秋水仙碱组与病理模型组比较 COL-IV,TGFβ₁ mRNA 表达水平降低。表明了加味四逆散可有效的下调肝组织中 COL-IV,TGFβ₁ mRNA 的表达,推测其机制可能为抑制 HSC 的活化与增殖,减少 ECM 的生成,抑制细胞因子的分泌,从而发挥其抗肝纤维化的作用。鉴于加味四逆散组方简单,药源充足,疗效可靠,有望成为很有前途的抗肝纤维化药物,其抗肝纤维化机制值得进一步深入的研究。

[参考文献]

- [1] 孙守才,刘光炜. 加味四逆散治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的初步研究[J]. 陕西中医学院学报,2001,24(1):46.
- [2] 孙守才,李晓苗,曾福海,等. 加味四逆散防治大鼠免疫性肝纤维化的实验研究[J]. 陕西中医学院学报,2002,25(2):32.
- [3] 孙守才,刘光炜,曾福海,等. 加味四逆散对肝纤维化大鼠血清透明质酸、层粘连蛋白、IV 型胶原及肝脏超微结构的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2002,(11):56.
- [4] 中华医学会传染病寄生虫病学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[C]. 2000 年 9 月西安会议.
- [5] Yin J L, Shackel N A, Zekry A, et al. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCT) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I[J]. Immunol Cell Biol, 2001,79(3):213.
- [6] 李益忠,刘旭东,黄彬,等. 行气活血饮治疗慢性乙型肝炎肝纤维化 42 例[J]. 吉林中医药,2005,25(7):28.
- [7] 栗广辉. 软肝消痞口服液抗肝纤维化的临床研究[J]. 吉林中医药,2003,23(7):9.
- [8] 王劲松. 肝纤溶颗粒治疗肝纤维化 30 例[J]. 长春中医药大学学报,2007,23(8):50.
- [9] 陈新. α1b-干扰素白蛋白诱导大鼠免疫肝纤维化的抑制作用[J]. 实用肝脏病杂志,2007,35(10):303.
- [10] 金博,廖丹,孙涛,等. 人工虫草菌丝及锌减少肝纤维化大鼠肝脏胶原的沉积[J]. 天津医药,2007,35(10):761.

[责任编辑 聂淑琴]